製品コード 9131

研究用

TaKaRa

E.coli HST16CR Competent Cells

説明書

v201210Da

I. 内容

E. coli HST16CR Competent Cells	100 μl × 10 本
pUC19 plasmid（0.1 ng/ μl）	10 μl
SOC 培地＊	1 ml × 10 本

＊：SOC 培地の組成：

2%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	$MgSO_4$
10 mM	$MgCl_2$
20 mM	Glucose

II. 特性および用途

コンピテントセルは、外来 DNA を取り込む能力を持つ受容菌で、遺伝子組換え体プラスミドなどを取り込みます。形質転換の際に重要なツールです。タカラバイオでは、Hanahan の方法に改良を加え、このコンピテントセルを調製しました。
E. coli HST16CR Competent Cells は高効率コンピテントセルとして実績のある *E. coli* HST08 Premium Competent Cells をベースに、ColE1 ori の複製に関係する遺伝子 *pcnB* を欠損させた株です。*pcnB* の欠損により、pUC 系ベクターで形質転換を行った場合にベクターのコピー数が低くなるため、高コピーベクターではクローニングが難しい膜貫通ドメインを持つタンパク質等、大腸菌の生育を阻害する遺伝子のクローニングに有効です。
E. coli HST08 Premium Competent Cells をベースにしているため、外来のメチル化 DNA を切断する遺伝子群 (*mrr-mcrBC-hsdRMS*)、*mcrA* を欠失しており、メチル化された DNA のクローニングも可能です。
また、pUC 系プラスミドでの形質転換の際には、β- ガラクトシダーゼの α- 相補性を利用し、X-Gal 添加による青白選択を行うことができ、組換え体の選択が容易です。
X-Gal：5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β -D-Galactoside

III. 使用方法（プラスミドベクターで形質転換する場合）

（1） *E. coli* HST16CR Competent Cells を使用直前に、氷中で融解する。
（2） 融解したら、穏やかに混和して均一にし、100 μl のコンピテントセルを 14 ml 丸底チューブ（ファルコン・ラウンドチューブ等）に移す（ボルテックスは使用しない）。
（3） 形質転換する DNA を加える（10 ng 以下が望ましい）。
（4） 氷中、30 分間放置する。
（5） 42℃で 45 秒間インキュベートする。
（6） 氷中 1 ～ 2 分間放置する。
（7） あらかじめ 37℃に保温しておいた SOC 培地を最終 1 ml になるように加える。
（8） 37℃で 1 時間振とうする（160 ～ 225 rpm）。
（9） プレートに適当量まく。＊
（10） 37℃で一晩放置する。

＊：プレートにまく液量は直径 9 cm プレートの場合 100 μl 以下にしてください。

【使用上の注意】

1. コンピテントセルは必要本数だけを取り出し、運搬時はドライアイス／エタノールに入れてください。
2. 14 ml 丸底チューブ（BD 社 Code 352059 または 352057 等）の他、1.5 ml マイクロ遠心チューブを用いても形質転換は可能ですが、効率が若干悪くなることがあります。
3. 100 μl のコンピテントセルを用いる場合、形質転換に使用する DNA の量を、高純度なもので 10 ng 以下にしてください。DNA 量を増やすと、効率は悪くなります。
4. スケール（コンピテントセルの量など）を変えたり、他のチューブを用いたりする場合には、最適の条件を検討する必要があります。（例えば、1.5 ml マイクロ遠心チューブを用いるときは、42℃で 60 秒間インキュベートしてください。）
5. 回復培養は SOC 培地の他、L-broth や ψ b-broth でも構いませんが、若干効率が悪くなることがあります。
   - L-broth：10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl/1 L water
     pH を 1 N NaOH で 7.5 前後に調整し、オートクレーブする。
   - ψ b-broth： 20 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$/1 L water
     pH を 1 N KOH で 7.5 前後に調整し、オートクレーブする。
6. プレート塗布時に希釈が必要な場合は、使用方法（7）で加えた培地で行ってください。
7. L- プレート： 10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl/1 L water
   pH を 1 N NaOH で 7.5 前後に調整し、1.5%になるよう agar を添加してオートクレーブする。
8. X-Gal を添加する場合は以下のようにしてください。
   - 20 mg/ml X-Gal（ジメチルホルムアミドに溶解）を、100 ml 寒天培地に 200 ～ 300 μl 添加する。
9. 一度融解したコンピテントセルを再度凍結保存することはお勧めしません。やむを得ず行う場合、ドライアイス／エタノール中で凍結させ、− 80℃で保存してください。ただし、形質転換効率は 1 オーダー以上低下する可能性があります。

IV. 品質

［1］形質転換効率
プラスミドベクターを用いて形質転換する場合の方法により 1 ng の pUC19 プラスミドで形質転換し、Amp^+ のプレートでコロニーを選別した。
このとき、＞ 1×10^8 colonies/μg・pUC19 プラスミドの効率を得た。

［2］β - ガラクトシダーゼのα - 相補性の確認
pUC19 プラスミドを用いて形質転換を行い、100 μg/ml のアンピシリン、60 μg/ml X-Gal を含む L- 寒天培地にプレートした場合、青色のコロニーが出現することを確認している。

V. Genotype

E. coli HST16 CR：
F^-, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA*96, *phoA*, Φ80d *lacZ*ΔM15,
Δ（*lacZYA - argF*）*U169*, Δ（*mrr - hsdRMS - mcrBC*）, Δ*mcrA*, Δ*pcnB*, λ^-

VI. Cell density

1 ～ 2 × 10^9 bacteria/ml

VII. 保存

－ 80℃

注意：保存は－ 80℃以下で行ってください。温度管理が不十分な場合、形質転換効率が低下することがあります。そのような事態が予想される場合は、付属の pUC19 を用いて形質転換効率を確認の上、使用してください。
液体窒素では保存しないでください。

VIII. 参考文献

1) Hanahan,D. (1983) *J.Mol.Biol*., **166**, 557.
2) Messing,J. (1985) *Gene* **33**,103.
3) Lopilato J. *et al*. (1986) *Mol Gen Genet*. **205**(2):285-90.

IX. 関連商品

DNA Ligation Kit ＜ Mighty Mix ＞ (製品コード 6023)
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG（製品コード 6024）
E. coli HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）
E. coli HST08 Premium Electro-Cells（製品コード 9028）
pUC118 DNA（製品コード 3318）
pUC119 DNA（製品コード 3319）
制限酵素切断 BAP 処理済 pUC118 DNA（製品コード 3320 ～ 3324）
X-Gal（5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside）(製品コード 9031）
NucleoSpin® Plasmid（製品コード 740588.10/.50/.250）＊
NucleoBond® Xtra Midi（製品コード 740410.10/.50/.100）＊

＊「NucleoSpin® Plasmid」「NucleoBond® Xtra Midi」など、MACHEREY-NAGEL 社のプラスミド抽出製品をご使用の際は、取扱説明書に記載のローコピーのプラスミドを抽出するプロトコールに従ってください。

X. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201210Da